

学校编码: 10384

密级

学号: 24520121153157

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

慢性阻塞肺病大鼠脑功能改变及其相关分子机制研究

The study of brain function changes and related molecular mechanism of rat with chronic obstructive pulmonary disease

严 亚

指导教师姓名: 张家兴 教授

专业名称: 生理学

论文提交日期: 2015年05月

论文答辩日期: 2015年05月

2015年05月

慢性阻塞性肺病大鼠脑功能改变及其相关分子机制的研究

严亚

指导教师

张家兴

教授

厦门大学

2.5cm

2.5cm

厦门大学博士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的

慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 以不完全可逆的气流受限和全身系统炎症为特征, 可造成脑部供氧不足和神经炎症, 导致脑细胞损伤。本研究利用分子生物学等方法探究 COPD 大鼠脑损伤的分子机制, 并为快速诊断出 COPD 和临床治疗提供依据。

材料和方法

材料: 雄性 SD 大鼠由厦门大学实验动物中心提供, 体重 230-280g, 随机分成 4 组, 健康对照组, 吸烟组, 脂多糖组, 吸烟+脂多糖组, 饲养在相同环境下, 给予充足的水和食物。

研究方法: 我们通过被动吸烟和气管注射脂多糖进行 COPD 大鼠模型的复制, 通过 Morris 水迷宫测试, openfield 测试以及平衡木测试来判断大鼠行为是否发生改变。通过对低氧诱导因子、炎症因子、特异性脑蛋白进行分子生物学等实验来探究 COPD 大鼠脑损伤的分子机制。

结果

1) 与对照组相比, 吸烟组和脂多糖+吸烟组体重均显著减轻 ($P<0.001$, $P=0.003$)。肺功能参数如第 50s 气道阻力显著增加 (FEV50/FVC%), 功能性残气量显著增加 (FRC), 肺部顺应性显著增加 (Cchord), 肺部总量显著增加 (TLC), 呼气时间显著增加 (T_e) ($P<0.01$)。

2) 与对照组相比, 水迷宫测试, 经过平台次数, 吸烟组明显下降 ($P<0.05$); 经过平台所在象限的时间占总时间的比例, 吸烟组和脂多糖组都显著减少 ($P<0.01$; $P<0.05$)。和对照组比较, open-field 结果显示吸烟组有明显的焦虑症的特征, 表现为越格数显著增加 ($P<0.001$), 中间格数增加, 大便粒数显著增加 ($P<0.05$), 趴墙次数显著增加 ($P<0.001$); 脂多糖组有抑郁的特征, 表现为越格数显著减少 ($P<0.001$), 中间格数减少, 趴墙次数显著减少 ($P<0.01$), 修饰次数显著减少 ($P<0.05$), 吸烟+脂多糖组有抑郁的特征, 表现为越格数减少, 中间格数减少, 趴墙次数显著减少 ($P<0.001$), 修饰次数显著减少。平衡木测试,

摘要

和对照组比较，脂多糖和脂多糖+吸烟组在平衡上所花的时间都显著增多 ($P<0.05$)，吸烟组没有显著差异。

3) 分子生物学实验，和对照组比较，模型组炎症因子，低氧诱导因子，脑损伤因子在模型组中发生了改变且有统计学意义；和对照组比较，吸烟组大鼠脑组织中的髓鞘碱性蛋白 (MBP)，S100 β 显著减少 ($P<0.05$; $P<0.05$)；少突胶质细胞髓鞘相关蛋白 (OMGP)，血影蛋白降解产物 120 (SBDP120) 显著增多 ($P<0.01$; $P<0.05$)。

结论

我们成功地复制出 COPD 大鼠模型，模型组的行为发生了明显的改变，包括空间记忆能力、平衡能力的下降，大鼠有焦虑或者抑郁的特征；低氧诱导因子，炎症因子在血浆中的水平增高导致了 COPD 大鼠脑部的损伤，从而使脑损伤因子在血浆中含量升高和脑组织少突胶质细胞和神经细胞中特异性蛋白含量发生变化 (MBP, S100 β 显著减少以及 OMGP, SBDP120 显著增加)，通过相关性分析，低氧诱导因子，炎症因子的升高可以解释脑损伤的分子机制。需要进一步研究筛选出理想的生物标记物，为临床快速诊断 COPD 提供依据。

关键词：低氧 炎症 吸烟 分子标记物 慢性阻塞性肺病

Abstract

Objectives

The irreversible airflow limitation characterized by chronic obstructive pulmonary disease (COPD) causes a decrease in the oxygen supply to the brain, and thus may result in the damages in the brain cells. The present study was designed to investigate the damages in brain cells in rats with COPD, by using various methods based on methods, to clarify the mechanisms underlying the physiological and psychological changes in COPD. We expected our findings would be help for clinical therapy of COPD.

Materials and methods

Materials: All animal research was approved by XM University Committee on Animal Research. Every effort was made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals. The male Sprague Dawley (clean animals) were acquired from the animal center of xia men university. All rats were kept in the same standard animal room with constant temperature and lights, given enough food and water. The weight of rats range from 230 to 280g, randomly divided to four groups, Sham control, Cs group, Lps group, Cs+Lps group .

Methods: We used cigarette smoke and intratracheal instillation of lipo-polysaccharide in rats to establish the model of rat COPD. Morris water maze (MWM), open-field test, beam-balance test were done to see whether the behavior changes in rat. In the end we explored the molecular mechanism of brain injury of COPD in further.

Results:

1) Compared with sham controls, model groups had lower weight ($p < 0.01$);

enhanced FEV50/FVC,FRC,Cchord,TLC,Te($p<0.01$); rats in model groups lung infected by HE staining, indicates that our COPD rat model mimic the clinical situations with pathological changes to the COPD patients and can be taken as an effective animal model for COPD research.

- 2) Compared with sham controls,In the MWM task,the spatial memory impaired : the crossing time of Cs group is significantly lower ($P<0.05$) ; % of time in the first quadrant of Cs group,as well as Lps group,is significantly lower than sham controls ($P<0.05$) . In the open-field test: the Cs group became active than sham controls,However, Lps group and Cs+Lps group behaved inactive.In the beam-balance test,compared with sham control, the time of Lps rats spent on crossing the beam is significantly longer ($P<0.01$) .
- 3) Compared with sham controls, our targeted-biomarkers including the specific brain protein, inflammation cytokine, hypoxia inducible factor,model groups (other three groups) had significantly changes.

Conclusion

The rat model of COPD was tested usefully. We found that compared with sham control, our model groups had cognitive impairment especial in the spatial memory; mood changes such as anxiety(Cs group) or depression(Lps and Cs+Lps group), worse balance ability. The proteins we chosen done damage to brain injury may explain the mechanism of brain injury, ideal candidate will be chosen in further research, providing evidence for clinical rapid diagnosis of COPD

Key words: hypoxia; inflammation; cigarette smoke; biomarker; COPD

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 文献综述	1
1.1 慢性阻塞性肺病 (COPD) 脑研究简介	1
1.2 COPD 的诱发因素	2
1.2.1 低氧导致 COPD 的发生	2
1.2.2 COPD 伴随炎症反应	3
1.2.3 吸烟对 COPD 的影响	3
1.3 COPD 造成脑损伤及引起行为改变	4
1.3.1 COPD 导致脑损伤	4
1.3.2 COPD 引起行为的改变	8
第二章 实验材料和方法	12
2.1 实验材料	12
2.2 试剂与仪器	12
2.2.1 主要试剂	12
2.2.2 主要试剂的配制	14
2.2.3 实验设备	17
2.3 实验方法	17
2.3.1 COPD 大鼠造模建立	17
2.3.2 行为测试	18
2.3.3 分子生物学实验	21
第三章 实验结果	27
3.1 大鼠模型的评价	27
3.1.1 大鼠一般情况	27
3.1.2 大鼠肺组织、气道病理改变的结果	28
3.1.3 大鼠肺功能结果	28
3.1.4 大鼠血常规血气的变化	29
3.2 行为学测试结果	29

3.2.1 COPD 大鼠情绪改变	29
3.2.2 COPD 大鼠空间认知能力的变化	31
3.2.3 COPD 大鼠平衡能力的变化	32
3.3 低氧诱导因子在 COPD 大鼠血浆中的变化	33
3.4 炎症因子在 COPD 大鼠血浆中的变化	34
3.5 大鼠脑损伤后引起少突胶质细胞和神经元释放特异性脑蛋白	37
3.6 大鼠血浆中低氧诱导因子、炎症因子和脑损伤因子的关系	41
第四章 讨论	42
4.1 COPD 大鼠行为的改变	42
4.2 低氧、炎症对脑细胞损伤的影响	44
4.3 导致 COPD 大鼠行为和脑蛋白分子变化的可能机制	46
总结与展望	51
参 考 文 献	52
英文缩略词表	72
致 谢	70

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Review	1
1.1 The simple introduction of study of COPD	1
1.2 The pathogeny of COPD	2
1.2.1 Hypoxia lead to the genesis of COPD.....	2
1.2.2 The Inflammation effect on COPD	3
1.2.3 The cigarette smoke impact on COPD.....	3
1.3 The COPD lead to brain injury and behavior changes	4
1.3.1 Brain injury of COPD.....	4
1.3.2 The behavior changes of COPD.....	8
Chapter 2 Materials and Methods	12
2.1 Materials	12
2.2 Reagent and instruments	12
2.2.1 Major reagent	12
2.2.2 Preparation of reagent.....	13
2.2.3 Experiment instrument	16
2.3 Methods	17
2.3.1 Establish the rat model of COPD.....	17
2.3.2 The method of behavior test.....	18
2.3.3 The method of molecular biology.....	20
Chapter 3 Results	27
3.1 Evaluted of rat COPD model	27
3.2 The change of COPD rat behavior	29
3.3 The damage of hypoxia inducible factor to COPD brain injury	33
3.4 The damage of inflammation cytokine to COPD brain injury	34
3.5 The damage of specific brain protein to COPD brain injury	37
3.6 The correlation of between hypoxia inducible factor, inflammation and brain injury protein	41

Chapter 4 Dissucion.....	42
4.1 The behavior changes of COPD rats	42
4.2 The effect of hypoxia and inflammation on COPD.....	44
4.3 The mechanism of COPD specific brain protein and behavior changes ...	46
Conclusion and prospect	51
Reference	52
Abbreviation.....	69
Acknowledgement	70

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 文献综述

1.1 慢性阻塞性肺病（COPD）脑研究进展

慢性阻塞性肺病（chronic obstructive pulmonary disease, COPD）是一种气流受限为特征的慢性呼吸系统疾病，气流受限不完全可逆，通常呈进行性发展，多与肺部对有害颗粒物或有害气体的异常炎症反应有关。在西方，影响到超过 45 岁人群的 10-15%，中国 40 岁以上的人群 COPD 患病率高达 8.2%，在主要致死性疾病排名中，其在城市是第 4 位，在农村是第 1 位（Bourdin et al., 2009; Barnes et al., 2010）。在未来 15 年里，COPD 将会是第三大致死疾病和第五大致残疾病。在全世界范围内，其死亡率到 2020 年可能上升到第 3 位，这与心脏疾病及中风的死亡率不断下降的趋势形成了强烈的对比（Balasubramanian et al., 2006）。COPD 患病人数多，病死率高，且由于其缓慢进行性发展，严重影响患者的身体健康和生活质量，COPD 患者所面临的症状负担和与这个疾病有联系的健康保健费用都很大。因此对 COPD 进行病因探讨、病情准确评估与有效治疗至关重要。

目前，COPD 病因、发病机理、治疗和护理方面都得到了广泛的研究，在 PubMed 数据库里每年都有约 10000 篇的相关研究论文发表（Hung et al., 2009）。COPD 不但累及肺脏，而且可引起全身性的不良反应。近年来，研究发现 COPD 全身性的不良反应是 COPD 疾病高发病率和死亡率及生活质量下降的主要原因。因此，COPD 肺外系统病变也得到了广泛的重视（Kaptein et al., 2009），中枢神经系统便是其中广受关注的一个。不可逆的气流受限可引起动脉血氧饱和度的降低，进而引起脑部供氧不足。与其它组织器官不同，脑组织一直处于活跃状态，虽然占人体体重不到 2%，但耗氧量却占全身耗氧量的 25%，血流量也占心脏输出血量的 15%。因此，脑组织对缺氧极其敏感。COPD 由于不可逆的气流受限，造成脑部长长期慢性供氧不足，最终会导致脑细胞损伤。此外，研究表明 COPD 患者全身系统性炎症加剧了神经损伤（Finkelstein et al., 2010）。相关研究发现，COPD 患者伴有多种形式的认知能力损害（Norwood et al., 2007; Schneider et al., 2010）和严重的睡眠障碍（Mathur et al., 1999），其伴有的抑郁和/或焦虑症约有

40%，远高于心血管病、肿瘤和其它慢性疾病(Lomas et al., 2008; Victor et al., 2012)。Hung 通过对 4150 名老年人的大样本(其中 12%患有 COPD)研究和 Kaptein 对过去 50 年内 COPD 患者行为研究资料进行回顾和分析(Schneider et al., 2010)均显示, COPD 中枢神经系统病变导致了患者的日常生活能力严重下降, 且与病情高度相关, 并已成为 COPD 严重化的标志或先兆, 预示其低治愈率和高死亡率(Victor et al., 2012)。因此, COPD 中枢神经系统病变的认识对评估病情严重程度、病情的恶化和病情的预后具有重要意义。而脑是最重要的中枢神经系统, 寻找脑的可靠的生物标记物成为确诊 COPD 的新方向。我们研究将明确 COPD 中枢病变及其与病情严重程度的关系。生物标记物的建立有助于 COPD 中枢病变的早期诊断、COPD 病情恶化和预后的评估, 用来指导临床制定更为科学的治疗方案, 降低致残率和死亡率, 减轻医疗负担。

1.2 COPD 的诱发因素

COPD 特征之一是气流受限, 呈进行性发展, 必然会导致脑部供氧减少。因为大脑特别容易受动脉血气饱和度的影响, 因此大脑无疑会受到低氧带来的影响。此外, COPD 病人伴随全身性系统炎症, 可能会导致加剧神经损伤(Barnes, 2010) 大脑损伤的主要临床特征有神经生理学的缺陷(Borson et al., 2010; Ortapamuk et al., 2006; Shim et al., 2001; Sicard et al., 2005; Sinha et al., 2009) 和焦虑(Barnes et al., 2010; Dodd et al., 2010) 和生理学的缺陷(Barnes et al., 2010)。同时大脑灌注损害(Shim et al., 2001) 和大脑代谢降低(Ashburner et al., 2007; Kumar et al., 2008; Von et al., 2005; Zhang et al., 2010) 方面同样有报道。COPD 包括以上所有特征, 由此推断 COPD 病人脑部确实受到损伤。COPD 的发病机制目前还不明确, 本课题主要探讨低氧、炎症、吸烟对 COPD 的影响。而低氧、炎症、吸烟会引起 COPD 患者脑损伤进而改变其相应行为学。

1.2.1 低氧导致 COPD 的发生

常见的低氧可分为持续性低氧(continuous hypoxia, CH) 和间歇性低氧(intermittent hypoxia, IH)。持续性低氧常见于逗留或居住于高原低氧环境的人群中, 而 COPD 因不可逆的气流阻塞也可以造成机体持续性低氧。

暴露在低氧环境中会引起短期和长期的适应机制。一般来说, 会引起肺通气增加, 红血球增多症, 机体通过这些机制来提高氧气对重要器官(脑) 输送氧气

的能力 (Mazumdar et al., 2009; Majmundar et al., 2010; Papandreou et al., 2006; Webster et al., 2003)。然而这些补偿机制并不一定能满足机体中枢神经系统对氧气的需求,特别是当长期暴露在低氧环境中。为了适应长期缺氧,大脑表现出非凡的结构性可塑能力和代谢变化。大脑显著的结构变化就是大脑毛细血管网络的重塑。之前的研究表明即使暴露在低氧环境中三周,大脑的毛细血管的密度也会显著增加 (Boero et al., 1999; Harik et al., 1999; Mironov et al., 1994)。大脑结构的可塑性和代谢机制对低氧的适应是协同的。例如增加葡萄糖的转运 (Harik et al., 1994), 增加代谢葡萄糖的速度 (Harik et al., 1995), 细胞色素氧化酶活性 (LaManna et al., 1996)。在大鼠低氧暴露三周之后这些脑代谢适应机制都被发现。

这些系统和局部的适应机制的基础是一些相关分子的基因被激活,如红细胞生成素,血管上皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) (Semenza, 2001), 葡萄糖转运蛋白 (GLUT-1), 葡萄糖降解酶等分子的基因。这些基因通过共同的调节机制结合上 HIF-1 α 才能激活目标基因的转录。HIF-1 是异质二聚体的转录因子包含 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基。HIF-1 β 是其他几个转录因子的一个异源二聚化组分,它在组织中持续表达,然而 HIF-1 α 对于 HIF-1 是独特的,它的表达受氧气浓度的严格调控。HIF-1 α 在常氧下被泛素一蛋白酶系统降解而在低氧状态下稳定表达 (Kaelin et al., 2008; Kaelin et al., 2008; Lendahl et al., 2009; Majmundar et al., 2010)。研究表明在啮齿动物的脑组织中 HIF-1 的目的基因表达上调,如 VEGF 和 GLUT-1 (Kuo et al., 1999)。

在脑和心脏中 VEGF 是 HIF-1 α 的最重要的靶基因 (Bernaudin et al., 2002; Cai et al., 2003)。Chavez 等 (2000) 首次在慢性缺氧大鼠模型的脑组织中证实 HIF-1 α 表达上调。随后 McLaren 等 (2006) 在贫血的大鼠模型的脑组织中也发现了 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达的上调。Bianciardi 等人 (2006) 在慢性低氧体内实验发现 HIF-1 α 特异性在脑组织,肌肉,肾皮层里表达上调。Trollmann 等人 (2007) 在新生小鼠急性低氧模型中发现,脑组织中 HIF-1 α 和 VEGF 表达的上调。Wang 等 (2009) 通过建立慢性间歇性低氧的大鼠模型证明 HIF-1 α 在脑组织表达上调。Yu 等 (2011) 通过双侧颈动脉缺血大鼠模型证明 HIF-1 α 在脑

组织中特别是海马 CA1 区表达上调。Victor 等（2012）在 COPD 病人血浆中发现 VEGF 表达上调。

最近的报道也表明 COPD 病人最常见的抱怨是由低氧引起的症状(Zhang et al., 2012)，持续性低氧间接使 COPD 病人的致死率和致残率增加。

1.2.2 COPD 伴随炎症发生

COPD 伴随全身性系统炎症的疾病（Agusti et al., 2003; Barnes et al., 2010 Schunemann et al., 2002），但 COPD 是全身性系统炎症疾病的来源还不是很清楚。证明 COPD 是全身性系统炎症的证据大都来自炎症细胞因子水平的升高，这使得人们对炎症的生物标记物的分子水平的改变和它们的临床和生理测试的相关性的研究产生了极大的兴趣。

筛选有效的炎症标记物有利于提高判断 COPD 致死率的能力。很多研究都从全身性系统炎症因子中筛选有效分子标记物。Gan 等（2004）通过研究发现稳定期的病人中 C-急性蛋白（CRP），促炎症性细胞因子（纤维蛋白原，白细胞，肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）、白介素 6（IL-6）和白介素 8（IL-8））的分子水平升高，且是 COPD 死亡的主要原因。Victor 等（2007）研究血浆中基质金属蛋白（MMP-9），TNF- α ，IL-8，粒细胞-巨噬细胞刺激因子（GMSF）等 30 多种蛋白旨在找到流动血浆生物标物。Breyer 等(2012)选择的炎症因子标记物急性蛋白（CRP）、纤维蛋白、TNF α 。Lomas 等（2008）通过检测 COPD 病人和对照组血浆中 CC-16 含血浆量的变化情况认为 CC-16 炎症因子可能是 COPD 有效的标记物。

在 COPD 病人中，血浆中的炎症因子和有修复作用的因子是与重要的临床参数和生存系数存在相关性的生物标记物。Gan 等(2004)通过检测 COPD 病人第一秒用力呼吸容量（FVC），最大肺活量（TL）这些肺功能指标和系统炎症的标记物：CRP、纤维蛋白原、淋巴细胞、TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的含量，结果显示肺功能指标与全身性系统炎症标记物含量呈负相关，即当病人肺功能降低时，炎症因子的含量增加。全身性系统炎症引起动脉粥样硬化，诱发心血管疾病，导致骨骼肌肌肉功能的丧失，骨质缺乏，抑郁（Agusti et al., 2005）。全身性系统炎症的严重程度和 COPD 病人的临床表现高度相关。有研究证明 COPD 病人血

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.